

PCT

ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIETE INTELLECTUELLE
Bureau international



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁵ : C12N 15/12, 15/13	A2	(11) Numéro de publication internationale: WO 94/29446 (43) Date de publication internationale: 22 décembre 1994 (22.12.94)
---	----	---

(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR94/00714 (22) Date de dépôt international: 15 juin 1994 (15.06.94) (30) Données relatives à la priorité: 93/07241 16 juin 1993 (16.06.93) FR (71) Déposant (<i>pour tous les Etats désignés sauf US</i>): RHONE-POULENC RORER S.A. [FR/FR]; 20, avenue Raymond-Aron, F-92160 Antony (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (<i>US seulement</i>): SCHWEIGHOFFER, Fabien [FR/FR]; 53, boulevard de la Libération, F-94300 Vincennes (FR). TOCQUE, Bruno [FR/FR]; 259, boulevard Péreire, F-75017 Paris (FR). (74) Mandataire: BECKER, Philippe; Rhône-Poulenc Rorer S.A., Direction Brevets, 2, avenue Raymond-Aron, F-92165 Antony Cédex (FR).	(81) Etats désignés: AU, BB, BG, BR, BY, CA, CN, CZ, FI, HU, JP, KP, KR, KZ, LK, LV, MG, MN, MW, NO, NZ, PL, RO, RU, SD, SK, UA, US, UZ, VN, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Publiée <i>Sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport.</i>
--	---

(54) Title: INTRACELLULAR BINDING PROTEINS AND USE THEREOF

(54) Titre: PROTEINES INTRACELLULAIRES DE LIAISON (PIL) ET LEURS UTILISATIONS

(57) Abstract

Nucleic sequences, vectors containing same and therapeutical uses thereof, in particular for gene therapy, are disclosed. More specifically, nucleic sequences including a gene coding for an intracellular binding protein, and their use in gene therapy, optionally after being incorporated into suitable expression vectors, are disclosed.

(57) Abrégé

La présente invention concerne des séquences nucléiques, les vecteurs les contenant, et leurs utilisations thérapeutiques, notamment en thérapie génique. Plus particulièrement, la présente invention concerne des séquences nucléiques comprenant un gène codant pour une protéine intracellulaire de liaison (PIL), et leur utilisation en thérapie génique, éventuellement incorporées à des vecteurs d'expression appropriés.

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	GB	Royaume-Uni	MR	Mauritanie
AU	Australie	GE	Géorgie	MW	Malawi
BB	Barbade	GN	Guinée	NE	Niger
BE	Belgique	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BF	Burkina Faso	HU	Hongrie	NO	Norvège
BG	Bulgarie	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BJ	Bénin	IT	Italie	PL	Pologne
BR	Brésil	JP	Japon	PT	Portugal
BY	Bélarus	KE	Kenya	RO	Roumanie
CA	Canada	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CF	République centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KR	République de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KZ	Kazakhstan	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LK	Sri Lanka	SN	Sénégal
CN	Chine	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	LV	Lettonie	TG	Togo
CZ	République tchèque	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DE	Allemagne	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
DK	Danemark	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
FI	Finlande	MN	Mongolie	UZ	Ouzbékistan
FR	France			VN	Viet Nam
GA	Gabon				

PROTEINES INTRACELLULAIRES DE LIAISON (PIL) ET LEURS UTILISATIONS:

La présente invention concerne des séquences nucléiques, les vecteurs les contenant, et leurs utilisations thérapeutiques, notamment en thérapie génique. Plus 5 particulièrement, la présente invention concerne des séquences nucléiques comprenant un gène codant pour une protéine intracellulaire de liaison (PIL), et leur utilisation en thérapie génique, éventuellement incorporées à des vecteurs d'expression appropriés.

La thérapie génique consiste à corriger une déficience ou une anomalie (mutation, expression aberrante, etc) par introduction d'une information génétique 10 dans la cellule ou l'organe affecté. Cette information génétique peut être introduite soit in vitro dans une cellule extraite de l'organe, la cellule modifiée étant alors réintroduite dans l'organisme, soit directement in vivo dans le tissu approprié. A cet égard, différentes techniques de transfection et de transfert de gènes ont été décrites dans la littérature (Cf Roemer et Friedman, Eur. J. Biochem. 208 (1992) 211). Jusqu'à 15 aujourd'hui, les approches proposées dans l'art antérieur pour la thérapie génique consistent à transférer des gènes codant pour des polypeptides actifs impliqués dans des maladies génétiques (hormones, facteurs de croissance, etc), des gènes antisens, ou des peptides antigéniques pour la réalisation de vaccins. La présente invention concerne une nouvelle approche de la thérapie génique, consistant à transférer et à 20 exprimer dans une cellule (ou un tissu) cible un peptide intracellulaire capable d'interagir avec des composants cellulaires et ainsi d'interférer avec des fonctions cellulaires. La présente invention repose plus particulièrement sur la mise en évidence qu'il est possible d'exprimer in vivo des anticorps modifiés qui restent dans le 25 compartiment intracellulaire, et qui peuvent contrôler certaines fonctions cellulaires. L'invention repose également sur la mise en évidence qu'il est possible de cloner des séquences d'ADN codant pour de tels anticorps intracellulaires dans des vecteurs, notamment viraux, pour une utilisation en thérapie génique.

L'utilisation d'anticorps en thérapie humaine permet, en général, de cibler et neutraliser des complexes biologiques circulants et/ou localisés à la surface des 30 cellules, en entraînant une cascade d'événements gérés par le système immunitaire qui conduit à leur élimination. Cependant, dans beaucoup de cas, dont les cancers ou les maladies dues par exemple à des virus, cette approche est stérile car l'antigène responsable de la dérégulation des cellules atteintes est inaccessible aux anticorps

injectés. La présente invention offre une nouvelle approche thérapeutique particulièrement avantageuse, consistant à faire produire de manière continue et intracellulaire des anticorps ou agents thérapeutiques dont la liaison à leur épitope décroît et/ou annule la dérégulation.

5 La possibilité d'exprimer de manière recombinante des anticorps a déjà été décrite dans la littérature. Ainsi, le brevet EP 88994 décrit l'expression *in vitro* et la purification de régions variables de chaînes lourdes ou légères d'anticorps. De même, le brevet US 4,946,778 décrit l'expression *in vitro* de séquences d'ADN codant pour des anticorps modifiés composés de régions variables de chaîne lourde et légère d'un 10 anticorps reliées par un linker. Cependant, les anticorps décrits dans ce brevet sont inactifs, et généralement synthétisés sous forme de corps d'inclusion insolubles. Les anticorps doivent donc être purifiés puis soumis à des traitements chimiques (dénaturation, renaturations, etc) pour recouvrir une activité. La présente invention démontre la possibilité d'utiliser de telles séquences d'ADN pour l'expression 15 directement *in vivo* d'anticorps intracellulaires actifs. La présente invention démontre ainsi la possibilité d'utiliser de telles séquences d'ADN codant pour des anticorps intracellulaires, sous le contrôle de régions permettant leur expression dans les cellules mammifères, pour une thérapie génique, notamment chez l'homme. Cette nouvelle approche permet donc de cibler des composants cellulaires non accessibles par les 20 méthodes classiques de vaccination. De plus, cette approche n'implique pas le développement d'une réponse immunitaire, mais agit intracellulairement.

Un premier objet de l'invention réside donc dans une séquence d'acides nucléiques comprenant un gène codant pour une protéine intracellulaire de liaison (PIL) sous le contrôle de régions permettant son expression dans les cellules 25 mammifères.

L'invention concerne également des vecteurs contenant une séquence d'acides nucléiques telle que définie ci-dessus. Plus particulièrement, les vecteurs de l'invention sont d'origine virale, tels que les rétrovirus, les adénovirus, les virus adéno-associer, le virus de l'herpès, le virus de la vaccine, le virus HSV, etc.

30 L'invention concerne également l'utilisation de ces séquences d'acides nucléiques ou de ces vecteurs pour la préparation de compositions pharmaceutiques destinées au traitement chirurgical et/ou thérapeutique du corps humain ou animal.

Elle concerne aussi toute composition pharmaceutique comprenant un vecteur, notamment viral, ou une séquence d'acides nucléiques tels que définis ci-dessus.

Au sens de la présente invention, le terme protéine intracellulaire de liaison (PIL) désigne toute protéine ou fragment de protéine capable de reconnaître un composant de la cellule dans laquelle elle est exprimée, et d'interagir de manière sélective et affine avec celui-ci. Il peut s'agir d'interactions chimiques covalentes ou non covalentes. L'interaction avec le composant cellulaire (protéines, lipides, acides aminés, ARNm, ARNt, ARNr, ADN, etc) permet d'agir sur une fonction cellulaire dans laquelle est impliqué ledit composant, et ainsi de contrôler (stimuler, ralentir, inhiber) cette fonction.

Préférentiellement, les PIL selon l'invention sont constituées par des molécules dérivées d'anticorps ou ayant des propriétés de liaison comparables à celles d'un anticorps. En particulier, il s'agit de protéines ayant une sélectivité et une affinité suffisantes pour permettre une interaction *in vivo* ayant un effet neutralisant sur l'antigène. Ces molécules sont désignées dans ce qui suit anticorps intracellulaires, en raison de leurs propriétés et de leur localisation.

Les anticorps, molécules de la superfamille des immunoglobulines, sont synthétisés naturellement (essentiellement par les lymphocytes B) sous forme de protéines sécrétées. Ils sont donc libérés dans les compartiments extracellulaires (système circulatoire) où ils exercent leur activité (reconnaissance et liaison aux antigènes non-soi). Il a maintenant été montré qu'il est possible d'exprimer *in vivo* des gènes modifiés codant pour des anticorps intracellulaires, sans affecter les propriétés de spécificité et d'affinité des anticorps. Les séquences d'acides nucléiques selon l'invention, qui codent pour des anticorps intracellulaires, comprennent donc un gène d'anticorps modifié de façon à ce que l'anticorps ne soit pas sécrété. En particulier, le gène de l'anticorps est généralement modifié par délétion ou mutation des séquences responsables de sa sécrétion. Les PIL selon l'invention peuvent notamment être constituées de fragments d'anticorps, et par exemple de fragments Fab ou F(ab)'2 qui portent les domaines de liaison de l'antigène. L'utilisation de ce type d'anticorps intracellulaire implique cependant l'expression d'une séquence d'acides nucléiques comprenant plusieurs gènes codant respectivement pour les régions lourdes et légères de ces fragments, et elle implique également que ces chaînes s'assemblent correctement *in vivo*. Pour cette raison, une forme particulièrement avantageuse d'anticorps intracellulaires utilisables dans le cadre de l'invention est constituée d'un peptide correspondant au site de liaison de la région variable de la chaîne légère d'un anticorps

relié par un linker peptidique à un peptide correspondant au site de liaison de la région variable de la chaîne lourde d'un anticorps. L'utilisation de ce type d'anticorps intracellulaire, désigné ScFv, est intéressante car ils sont exprimés par un gène unique. La construction de séquences d'acides nucléiques codant pour de tels anticorps modifiés selon l'invention est illustrée dans les exemples.

Par ailleurs, les séquences d'acides nucléiques codant pour les anticorps intracellulaires selon l'invention peuvent également être modifiées par voie chimique, enzymatique ou génétique, en vue de générer des anticorps intracellulaires stabilisés, et/ou multifonctionnels, et/ou de taille réduite, et/ou dans le but de favoriser leur localisation dans tel ou tel compartiment intracellulaire. Ainsi, les séquences d'acides nucléiques de l'invention peuvent comprendre des séquences codant pour des peptides de localisation nucléaire (NLS). En particulier, il est possible de fusionner les séquences de l'invention avec la séquence codant pour le NLS du virus SV40, dont la séquence peptidique est la suivante : MPKKKRK (Kalderon et al, Cell 39 (1984) 499).

Comme indiqué plus haut, les séquences d'acides nucléiques selon l'invention comprennent des séquences permettant l'expression du ou des gène(s) codant pour les PIL dans les cellules mammifères. Généralement, les gènes PIL sont donc placés sous le contrôle de régions promotrices de la transcription et de la traduction, fonctionnelles dans la cellule mammifère dans laquelle l'expression est recherchée. Il peut s'agir de séquences homologues vis-à-vis de ladite cellule, c'est à dire de séquences responsables naturellement de l'expression de gènes dans ladite cellule. Il peut également s'agir de séquences d'origine différente, c'est à dire de séquences responsables de l'expression de protéines dans d'autres types cellulaires, de séquences responsables de l'expression d'anticorps dans les conditions naturelles, de séquences d'expression virales, par exemple présentes dans un vecteur dans lequel les séquences de l'invention sont incorporées, ou encore de séquences synthétiques ou semi-synthétiques.

S'agissant d'un usage pour l'homme, de nombreux promoteurs fonctionnels ont été décrits dans la littérature, tels que par exemple les promoteurs viraux CMV, SV40, E1a, MLP, LTR, etc. Des promoteurs cellulaires, tels que par exemple le promoteur du gène de la villine, présente un intérêt car permettent une expression tissu spécifique (limitée à l'intestin dans le cas de la villine).

Par ailleurs, les séquences d'expression peuvent également être modifiées, par exemple pour les adapter à l'expression dans un type particulier de vecteur ou de cellule, pour réduire leur taille, pour augmenter leur activité de promoteur de la transcription, pour générer des promoteurs inductibles, améliorer leur niveau de régulation, ou encore changer la nature de leur régulation. De telles modifications peuvent être effectuées par exemple par mutagénèse *in vitro*, par introduction d'éléments additionnels de contrôle ou de séquences synthétiques, ou par des délétions ou des substitutions des éléments originels de contrôle. Il peut être particulièrement avantageux d'utiliser des promoteurs tissu-spécifiques, afin de cibler l'expression de la PIL dans un type seulement de tissu.

Par ailleurs, lorsque la séquence d'acides nucléiques ne comporte pas de séquences d'expression, celle-ci peut être inscrite dans un vecteur d'expression, en aval d'une telle séquence.

Pour préparer un vecteur selon l'invention, il convient, dans un premier temps, d'identifier une fonction cellulaire, par exemple impliquée dans ou responsable d'une pathologie, sur laquelle on désire agir. Ensuite, il convient d'identifier un composant cellulaire approprié impliqué dans cette fonction, puis de déterminer quel PIL semble le plus adapté à ce composant (anticorps, dérivés, etc), en fonction de sa localisation, de son rôle, de sa nature, etc. Le PIL ayant été sélectionné, une séquence d'acides nucléiques correspondante peut être obtenue par les techniques de biologie moléculaire (synthèse chimique, clonage, modification enzymatique, etc), et insérée dans un vecteur approprié selon la méthodologie décrite dans les exemples.

Un autre objet de l'invention concerne des compositions pharmaceutiques comprenant au moins une séquence d'acides nucléiques ou un vecteur tels que définis précédemment.

Les séquences de l'invention peuvent être utilisées telles quelles, par exemple après injection à l'homme ou l'animal, pour induire l'expression intracellulaire d'une PIL en vue d'affecter une fonction cellulaire déterminée. En particulier, elles peuvent être injectées sous forme d'ADN nu selon la technique décrite dans la demande WO 90/11092. Elles peuvent également être administrées sous forme complexée, par exemple avec du DEAE-dextran (Pagano et al., J.Viro. 1 (1967) 891), avec des protéines nucléaires (Kaneda et al., Science 243 (1989) 375), avec des lipides (Felgner

et al., PNAS 84 (1987) 7413), sous forme de liposomes (Fraley et al., J.Biol.Chem. 255 (1980) 10431), etc.

Dans un mode de réalisation préféré de l'invention, les séquences nucléiques telles que définies précédemment sont incorporées dans un vecteur. L'emploi de tels vecteurs permet en effet de favoriser la pénétration dans les cellules, d'accroître la résistance aux enzymes, et d'augmenter la stabilité et les niveaux d'expression intracellulaires. Les vecteurs de l'invention peuvent être aussi bien plasmidiques que viraux. Cependant, on préfère utiliser un vecteur viral.

Dans un mode de réalisation préféré, l'invention concerne donc des séquences d'acides nucléiques telles que définies précédemment incorporées à un vecteur viral. L'invention concerne également tout virus recombinant comprenant, inséré dans son génome, au moins une séquence d'acides nucléiques codant pour une PIL.

Comme indiqué plus haut, différents virus sont susceptibles d'être utilisés comme vecteurs pour le transfert et l'expression *in vivo* de gènes selon l'invention. A titre d'exemple, on peut citer les rétrovirus (RSV, HMS, MMS, etc), le virus HSV, les virus adéno-associés, les adénovirus, le virus de la vaccine etc.

Avantageusement, le virus recombinant selon l'invention est un virus défectif. Le terme "virus défectif" désigne un virus incapable de se répliquer dans la cellule cible. Généralement, le génome des virus défectifs utilisés dans le cadre de la présente invention est donc dépourvu au moins des séquences nécessaires à la réPLICATION dudit virus dans la cellule infectée. Ces régions peuvent être soit éliminées (en tout ou en partie), soit rendues non-fonctionnelles, soit substituées par d'autres séquences et notamment par les séquences nucléiques de l'invention. Préférentiellement, le virus défectif conserve néanmoins les séquences de son génome qui sont nécessaires à l'encapsidation des particules virales.

Des virus recombinants défectifs dérivés de rétrovirus, de virus adéno-associés, du virus HSV (herpes simplex virus) ou des adénovirus ont déjà été décrits dans la littérature [Roemer et Friedmann, Eur. J. Biochem. 208 (1992) 211; Dobson et al., Neuron 5 (1990) 353; Chiocca et al., New Biol. 2 (1990) 739; Miyanohara et al., New Biol. 4 (1992) 238; WO91/18088; Akli et al., Nature Genetics 3 (1993) 224; Stratford-Perricaudet et al., Human Gene Therapy 1 (1990) 241; EP 185 573, Leviero et al., Gene 101 (1991) 195; EP 243204)].

Il est particulièrement avantageux d'utiliser les séquences nucléiques de l'invention sous forme incorporée à un adénovirus recombinant défectif.

Il existe en effet différents sérotypes d'adénovirus, dont la structure et les propriétés varient quelque peu, mais qui ne sont pas pathogènes pour l'homme, et notamment les sujets non immuno-déprimés. Par ailleurs, ces virus ne s'intègrent pas dans le génome des cellules qu'ils infectent, et peuvent incorporer des fragments importants d'ADN exogène. Parmi les différents sérotypes, on préfère utiliser dans le cadre de la présente invention les adénovirus de type 2 ou 5 (Ad 2 ou Ad 5). Dans le cas des adénovirus Ad 5, les séquences nécessaires à la réPLICATION sont les régions E1A et E1B.

Par ailleurs, la faible taille des gènes codant pour les anticorps intracellulaires selon l'invention permet de manière avantageuse d'incorporer simultanément, dans un même vecteur, plusieurs gènes codant pour des anticorps intracellulaires dirigés contre des régions différentes d'un ou de plusieurs composants cellulaires ciblés. Un mode de réalisation particulier de l'invention consiste donc dans un vecteur, notamment viral, comprenant au moins deux séquences d'acides nucléiques codant pour des protéines intracellulaires de liaison dirigées contre des épitopes différents.

Les virus recombinants défectifs de l'invention peuvent être préparés par recombinaison homologue entre un virus défectif et un plasmide portant entre autre la séquence d'acides nucléiques telle que définie ci-avant (Levrero et al., Gene 101 (1991) 195; Graham, EMBO J. 3(12) (1984) 2917). La recombinaison homologue se produit après co-transfection desdits virus et plasmide dans une lignée cellulaire appropriée. La lignée cellulaire utilisée doit de préférence (i) être transformable par lesdits éléments, et (ii), comporter les séquences capables de complémenter la partie du génome du virus défectif, de préférence sous forme intégrée pour éviter les risques de recombinaison. A titre d'exemple de lignée utilisable pour la préparation d'adénovirus recombinants défectifs, on peut mentionner la lignée de rein embryonnaire humain 293 (Graham et al., J. Gen. Virol. 36 (1977) 59) qui contient notamment, intégrée dans son génome, la partie gauche du génome d'un adénovirus Ad5 (12 %). A titre d'exemple de lignée utilisable pour la préparation de rétrovirus recombinants défectifs, on peut mentionner la lignée CRIP (Danos et Mulligan, PNAS 85 (1988) 6460).

Ensuite, les virus qui se sont multipliés sont récupérés et purifiés selon les techniques classiques de biologie moléculaire.

La présente invention concerne donc également une composition pharmaceutique comprenant au moins un virus recombinant défectif tel que défini précédemment.

Les compositions pharmaceutiques de l'invention peuvent être formulées en vue d'une administration par voie topique, orale, parentérale, intranasale, intraveineuse, intramusculaire, sous-cutanée, intraoculaire, etc.

Préférentiellement, les compositions pharmaceutiques contiennent des véhicules pharmaceutiquement acceptables pour une formulation injectable. Il peut s'agir en particulier de solutions salines (phosphate monosodique, disodique, chlorure de sodium, potassium, calcium ou magnésium, etc, ou des mélanges de tels sels), stériles, isotoniques, ou de compositions sèches, notamment lyophilisées, qui, par addition selon le cas d'eau stérilisée ou de sérum physiologique, permettent la constitution de solutés injectables.

Les doses d'acides nucléiques (séquence ou vecteur) utilisées pour l'administration peuvent être adaptées en fonction de différents paramètres, et notamment en fonction du mode d'administration utilisé, de la pathologie concernée, du gène à exprimer, ou encore de la durée du traitement recherchée. D'une manière générale, concernant les virus recombinants selon l'invention, ceux-ci sont formulés et administrés sous forme de doses comprises entre 10^4 et 10^{14} pfu/ml, et de préférence 10^6 à 10^{10} pfu/ml. Le terme pfu ("plaque forming unit") correspond au pouvoir infectieux d'une solution de virus, et est déterminé par infection d'une culture cellulaire appropriée, et mesure, généralement après 48 heures, du nombre de plages de cellules infectées. Les techniques de détermination du titre pfu d'une solution virale sont bien documentées dans la littérature.

L'invention a également pour objet toute cellule recombinante comprenant une séquence d'acides nucléiques telle que définie ci-avant.

Les séquences de l'invention, éventuellement incorporées à des vecteurs, et les compositions pharmaceutiques les contenant peuvent être utilisées pour le traitement de nombreuses pathologies. Elles peuvent donc être utilisées pour le transfert et l'expression de gènes *in vivo* dans tout type de tissu. Le traitement peut d'ailleurs être ciblé en fonction de la pathologie à traiter (le transfert au niveau d'un tissu particulier peut notamment être déterminé par le choix d'un vecteur, et l'expression par le choix d'un promoteur particulier). Les séquences ou vecteurs de l'invention sont avantageusement utilisées pour la production chez l'homme ou l'animal, *in vivo* et de manière intracellulaire, de protéines capables d'agir de manière spécifique sur des fonctions cellulaires diverses telles que la prolifération cellulaire, la

synthèse de métabolites, la synthèse de protéines, la réPLICATION et/ou la transcription de l'ADN, etc. La présente invention permet ainsi de traiter de manière spécifique, locale et efficace, de nombreux dysfonctionnements cellulaires à l'origine ou résultant de différentes pathologies, et en particulier les cancers, maladies virales ou bactériennes, ou, plus généralement, toute pathologie dans laquelle un médiateur cellulaire peut être identifié.

Utilisation pour le traitement de pathologies liées à la prolifération cellulaire

Dans un mode particulièrement avantageux, les séquences d'acides nucléiques de l'invention comprennent des gènes codant pour des PIL capables d'interagir et d'interférer avec l'activité de facteurs impliqués dans la prolifération cellulaire. La prolifération cellulaire met en jeu une multitude de facteurs, tels que des récepteurs membranaires (protéines G), des oncogènes, des enzymes (protéines kinases, farnésyl transférases, phospholipases, etc) des nucléosides (ATP, AMP, GDP, GTP, etc) des facteurs d'activation [facteurs d'échange des guanosines (GRF, GAP, etc), facteurs transcriptionnels, etc], etc. L'expression intracellulaire de PIL selon l'invention capables de lier et de neutraliser de tels facteurs permet de contrôler le processus de prolifération cellulaire. Ceci est particulièrement intéressant dans les situations où la prolifération cellulaire échappe aux mécanismes naturels de régulation, conduisant par exemple à l'apparition de tumeurs. De nombreux facteurs (produits des gènes oncogènes et facteurs impliqués dans la signalisation de l'effet des ces produits) ont en effet été associés à ces phénomènes de dérégulation de la prolifération cellulaire. Ainsi, 90 % des adénocarcinomes du pancréas présentent un oncogène Ki-ras muté sur le douzième codon (Almoguera et coll., Cell 53 (1988) 549). De même, la présence d'un gène ras muté a été mise en évidence dans les adénocarcinomes du colon et les cancers de la thyroïde (50 %), ou dans les carcinomes du poumon et les leucémies myéloïdes (30 %, Bos, J.L. Cancer Res. 49 (1989) 4682). De nombreux autres oncogènes ont aujourd'hui été identifiés (myc, fos, jun, ras, myb, erb, etc), dont des formes mutées semblent responsables d'un dérèglement de la prolifération cellulaire.

L'expression de PIL capables de lier ces facteurs cellulaires (préférentiellement leur forme oncogénique) et donc de ralentir ou d'inhiber leurs effets offre la possibilité d'une nouvelle approche thérapeutique des cancers.

Dans un mode particulièrement intéressant, la présente invention concerne des vecteurs contenant des séquences d'acides nucléiques comprenant un gène codant

pour un anticorps intracellulaire capable d'interagir avec le produit d'expression d'un oncogène ou avec un facteur intervenant dans la voie de signalisation d'un oncogène.

Parmi les oncogènes cibles, on peut citer au sens de l'invention les oncogènes ras, fos, jun, myc, myb et erb.

5 Parmi les facteurs intervenant dans la voie de signalisation d'un oncogène, on peut citer notamment les récepteurs membranaires, qui peuvent être ciblés au niveau de leurs domaines intracellulaires [protéines G, kinases (exemple : tyrosine kinase), phosphorylases, farnésyl transférases], les facteurs d'échange des nucléosides (facteurs GAP, GRF, etc), etc.

10 Plus préférentiellement, la présente invention concerne des vecteurs, notamment d'origine virale, contenant une séquence d'acides nucléiques codant pour un anticorps intracellulaire dirigé contre un oncogène ou un facteur intervenant dans la voie de signalisation d'un oncogène, constitué d'un peptide correspondant au site de liaison de la région variable de la chaîne légère d'un anticorps relié par un linker peptidique à un peptide correspondant au site de liaison de la région variable de la chaîne lourde d'un anticorps.

15 Plus particulièrement, l'invention concerne des virus recombinants défectifs exprimant un anticorps intracellulaire dirigé contre un facteur de la voie de signalisation ras-dépendante.

20 Comme le montrent les exemples, l'expression d'anticorps intracellulaires anti-p21 (produit d'expression du gène ras), anti-GAP, ou anti-p53 permet de réverter le phénotype transformant d'une cellule cancéreuse.

Utilisation pour le traitement de pathologies virales

25 Les séquences nucléiques selon l'invention peuvent encore être des séquences codant pour des anticorps intracellulaires capables d'interagir avec le cycle infectieux d'un virus pathogène (HIV, virus du papillome, etc).

30 Plus particulièrement, dans le cas du virus HIV, les agents antiviraux actuellement disponibles ou dans des protocoles de phases cliniques avancées ne permettent pas de bloquer le virus dans sa multiplication, mais tout juste de freiner la progression de la maladie. Une des principales raisons à cela réside dans l'apparition de souches résistantes à ces antiviraux. Le développement d'une vaccination efficace se heurte également à de nombreux obstacles : La variabilité génétique du HIV ne permet pas de définir une structure antigénique stable pour donner lieu à une réponse immunologique humorale ou cellulaire contre les différentes souches existantes.

Comme dans le cas des antiviraux où le virus résiste à une pression de sélection par le biais de mutations ponctuelles, dans les essais de vaccination tentés à ce jour, le HIV semble échapper au système immunitaire.

La présente invention constitue une nouvelle approche pour le traitement de l'infection par HIV, consistant à bloquer le virus lors de son cycle réplicatif par expression de PIL, et notamment d'anticorps intracellulaires. La présente invention permet en particulier de s'affranchir du problème de variabilité génétique du virus contrairement aux approches vaccinales et antivirales. Dans le cas de la vaccination classique, les réponses immunitaires mises en évidence ont principalement lieu contre des régions variables. Au contraire, l'utilisation d'anticorps intracellulaires selon l'invention permet de choisir un épitope non seulement conservé mais également indispensable à la fonction d'une protéine virale. De préférence, l'anticorps intracellulaire est dirigé contre un épitope d'une taille suffisante pour empêcher le virus de résister et de s'adapter par le biais de mutations ponctuelles. Par ailleurs, la faible taille du gène codant pour l'anticorps intracellulaire selon l'invention permet de manière avantageuse de cibler plusieurs régions (d'une seule ou de plusieurs protéines) à partir d'un même vecteur de thérapie génique.

Les deux principales protéines de régulation du virus, tat et rev, sont des cibles de première importance pour la mise en oeuvre de la présente invention. En effet, ces deux protéines sont indispensables pour la réPLICATION virale. De plus, l'expression d'ARN messagers anti-sens ou de ribozymes ciblant l'ARN messenger tat ou rev empêche la réPLICATION virale. Le mécanisme d'action de ces protéines est relativement bien documenté : tat est un facteur de transactivation de la transcription tandis que rev assure la transition entre les phases précoce et tardive du cycle réplicatif. Ces deux protéines exercent leur activité en se fixant sur les ARN messagers viraux, et la région peptidique nécessaire à cette fixation, indispensable pour leur fonction, est relativement bien délimitée. En outre, il a été montré que la surexpression de leur site de fixation sur l'ARN (région TAR pour tat et RRE pour rev) inhibe leur fonction sur l'expression virale.

Dans ces conditions, un mode particulièrement avantageux de l'invention réside dans l'utilisation d'une séquence d'ADN codant pour un anticorps intracellulaire dirigé contre les protéines tat ou rev et capable de neutraliser leur activité. Avantageusement, de tels anticorps sont dirigés contre la région de tat ou rev responsable de leur fixation sur l'ARN.

Des anticorps intracellulaires selon l'invention dirigés contre ces épitopes peuvent être préparés selon la méthodologie décrite dans les exemples. En particulier, concernant l'anticorps anti-tat, il peut être obtenu par modification génétique à partir de l'anticorps monoclonal T-B (12) (Hybridolab).

5 Une autre protéine cible importante dans la réPLICATION du HIV dont la fonction peut être facilement inhibée par un anticorps intracellulaire est la protéine de la nucléocapside NCP7. En effet, cette protéine joue un rôle important dans la rétro-transcription (phase précoce), dans l'intégration, et dans une phase tardive mais néanmoins importante : l'encapsidation. Cette multifonctionnalité s'explique par le fait
10 qu'elle a un rôle structural enzymatiquement actif. Elle a été décrite comme une hybridase qui permettrait la complexation des acides nucléiques viraux : ARN/ADN et ADN/ADN pendant la rétro-transcription ainsi que ARN/ARN et ARN/ARNt-lys3 au niveau de l'encapsidation. NCP7 apparaît indispensable pour la production de virus infectieux.

15 L'expression cytoplasmique par thérapie génique d'anticorps intracellulaires dirigés contre la NCP7 inhibant sa fonction dans la dimérisation des ARN viraux et dans l'encapsidation constitue un autre mode particulier de mise en oeuvre de l'invention.

20 Des anticorps intracellulaires selon l'invention dirigés contre des épitopes neutralisants de cette protéine peuvent être préparés selon la méthodologie décrite dans les exemples.

D'autres composants viraux peuvent également faire l'objet d'une thérapie génique selon l'invention, et notamment : le site de fixation à la molécule CD4 (exemple : la glycoprotéine d'enveloppe (gp120/41)), la région de multimérisation de l'enveloppe, le site de clivage gp120/gp41, la protéase, l'intégrase, et plus généralement toute protéine virale. Ces domaines ne sont généralement pas accessibles quand l'enveloppe est sous forme native. Pour cette raison, ils sont très peu immunogènes et une vaccination les mettant en jeu est impossible. La présente invention permet de cibler ces composants viraux, et possède ainsi un potentiel thérapeutique très supérieur. En outre, comme indiqué plus haut, la faible taille des gènes codant pour l'anticorps intracellulaire selon l'invention permet de manière avantageuse d'exprimer simultanément, dans un même vecteur plusieurs anticorps intracellulaires dirigés contre des régions différentes d'une ou de plusieurs de ces cibles.

Les séquences nucléiques selon l'invention peuvent également être des séquences codant pour des PIL capables d'interagir et d'interférer avec l'activité de facteurs impliqués dans la synthèse de métabolites, dans la synthèse protéique ou encore dans la réPLICATION et/ou transcription de l'ADN.

5 La présente invention sera plus complètement décrite à l'aide des exemples qui suivent, qui doivent être considérés comme illustratifs et non limitatifs.

Légende des figures

Figure 1 : (A) Carte de restriction du ScFv-ras. (B) Carte de restriction du ScFv-Gap.
10 (C) Effet neutralisant de l'expression transitoire d'un anticorps intracellulaire de l'invention sur le pouvoir transformant d'un oncogène ras ou Her2. Py = cellules contrôle; ScFv = cellules transectées par le plasmide psv2.ScFv.ras seul, VAL = cellules transectées par le vecteur exprimant ras oncogénique Ha-ras Val12; VAL+ScFv = cellules cotransectées par le plasmide psv2.ScFv.ras et Ha-ras Val12; HER2 = cellules transectées par le vecteur exprimant Her2 oncogénique; HER2+ScFv
15 = cellules cotransectées par le plasmide psv2.ScFv.ras et par Her2.

Techniques générales de biologie moléculaire

Les méthodes classiquement utilisées en biologie moléculaire telles que les extractions préparatives d'ADN plasmidique, la centrifugation d'ADN plasmidique en gradient de chlorure de césium, l'électrophorèse sur gels d'agarose ou d'acrylamide, la purification de fragments d'ADN par électroélution, les extraction de protéines au phénol ou au phénol-chloroforme, la précipitation d'ADN en milieu salin par de l'éthanol ou de l'isopropanol, la transformation dans *Escherichia coli*, etc ... sont bien connues de l'homme de métier et sont abondamment décrites dans la littérature [Maniatis T. et al., "Molecular Cloning, a Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1982; Ausubel F.M. et al. (eds), "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons, New York, 1987].

Les plasmides de type pBR322, pUC et les phages de la série M13 sont d'origine commerciale (Bethesda Research Laboratories).

30 Pour les ligatures, les fragments d'ADN peuvent être séparés selon leur taille par électrophorèse en gels d'agarose ou d'acrylamide, extraits au phénol ou par un mélange phénol/chloroforme, précipités à l'éthanol puis incubés en présence de l'ADN ligase du phage T4 (Biolabs) selon les recommandations du fournisseur.

Le remplissage des extrémités 5' proéminentes peut être effectué par le fragment de Klenow de l'ADN Polymérase I d'E. coli (Biolabs) selon les spécifications du fournisseur. La destruction des extrémités 3' proéminentes est effectuée en présence de l'ADN Polymérase du phage T4 (Biolabs) utilisée selon les recommandations du fabricant. La destruction des extrémités 5' proéminentes est effectuée par un traitement ménagé par la nucléase S1.

La mutagénèse dirigée *in vitro* par oligodéoxynucléotides synthétiques peut être effectuée selon la méthode développée par Taylor et al. [Nucleic Acids Res. 13 (1985) 8749-8764] en utilisant le kit distribué par Amersham.

L'amplification enzymatique de fragments d'ADN par la technique dite de PCR [Polymérase-catalyzed Chain Reaction, Saiki R.K. et al., Science 230 (1985) 1350-1354; Mullis K.B. et Falloona F.A., Meth. Enzym. 155 (1987) 335-350] peut être effectuée en utilisant un "DNA thermal cycler" (Perkin Elmer Cetus) selon les spécifications du fabricant.

La vérification des séquences nucléotidiques peut être effectuée par la méthode développée par Sanger et al. [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74 (1977) 5463-5467] en utilisant le kit distribué par Amersham.

Exemple 1 : Clonage et expression d'une séquence d'ADN codant pour un anticorps intracellulaire anti-ras

Cet exemple décrit le clonage et l'expression d'une séquence d'acides nucléiques codant pour protéine intracellulaire de liaison reproduisant les propriétés de l'anticorps monoclonal Y13-259. L'anticorps Y13-259 est dirigé contre les protéines Ras (ref. ATCC CRL 1742) (J. Virol. 43, 294-304, 1982), et est un anticorps neutralisant sur la fonction des protéines Ras oncogéniques une fois injecté dans les cellules [Smith et coll., (1986) Nature, 320, 540-543 ; Kung et coll., Exp. Cell. Res. (1986) 162, 363-371].

1.1. Préparation de la séquence d'ADN

Une séquence d'ADN codant pour un anticorps intracellulaire (fragment ScFv) a été préparée selon la technique décrite dans le brevet US 4,946,778. Cette séquence a ensuite été placée sous le contrôle d'un promoteur fonctionnel dans les cellules mammifère.

Les ARN poly A sont isolés à partir d'une culture cellulaire de l'hybridome qui secrète l'anticorps Y13-259 selon la technique décrite par Chirguin S.H. et al. [Biochemistry 18, 5294 (1979)]. Ces ARN sont utilisés pour une réaction de Reverse-Transcription à l'aide de primers formés d'hexanucléotides aléatoires. Les ADNc obtenus servent de matrice à deux réactions de PCR :

- 5 - l'une destinée à amplifier le fragment variable de la chaîne lourde (VH) de Y13-259 avec des primers spécifiques de VH murins,
- la seconde permettant d'obtenir le fragment VL en utilisant un mélange de 10 primers dérivés des séquences murines.

10 Deux fragments de 340 pb et 325 pb sont ainsi obtenus et ensuite assemblés grâce à un linker qui permet un positionnement correct du cDNA de VH en 5' de celui de VL. Ce linker code pour 15 acides aminés formés de trois répétitions du motif (Gly)₄ Ser [Orlandi, R. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 3833-3837 (1979)]. La séquence de l'anticorps intracellulaire est présentée sur la SEQ ID n° 1 (résidus 28 à 15 270). Cette séquence confère assez de degrés de liberté à la fusion VH-VL pour permettre leur assemblage en orientation parallèle et assurer une affinité correcte pour l'antigène.

20 La séquence d'acides nucléiques fusionnée VH-linker-VL est ensuite insérée dans un phagémide qui permet l'expression de l'anticorps intracellulaire (fragment ScFv) à la surface d'un phage M13 (figure 1A). Cette expression permet facilement l'identification et la sélection des anticorps intracellulaires qui reconnaissent correctement l'antigène.

1.2. Evaluation fonctionnelle de l'anticorps intracellulaire modifié.

25 La séquence d'ADN qui code pour l'anticorps intracellulaire modifié anti-Ras (VH-linker-VL) est isolée du phagémide par restriction, puis insérée dans le vecteur sv2 sous contrôle du couple enhancer promoteur précoce de SV40 (Schweighoffer et al. Science, 256, 825-827, 1992), afin de tester sa capacité à antagoniser les effets d'un Ras oncogénique. Le plasmide ainsi obtenu est désigné psv2.ScFv.ras. L'évaluation fonctionnelle a été effectuée selon plusieurs tests :

30 a) Transfection transitoire dans les cellules mammifères.

Pour l'évaluation par transfection transitoire dans les cellules mammifères, le plasmide psv2.ScFv.ras a été cotransféré dans les cellules NIH 3T3 selon le protocole décrit dans Schweighoffer et al. [Science, 256, 825-827 (1992)] avec un vecteur qui

permet l'expression d'un gène Ha-ras Val 12. L'état d'activation de la voie de signalisation étudiée a été enregistré par mesure de l'activité enzymatique obtenue à partir du gène rapporteur "chloramphenicol-acetyl transferase (CAT)" placé sous le contrôle d'un promoteur contenant éléments nucléotidiques répondant en "trans" à 5 l'action de Ras (RRE) également cotransférés : ces éléments RRE sont constitués par un promoteur hybride TK-enhancer du polyome (Waslyk et coll., EMBO, J. 7, 2475, 1988).

Les résultats obtenus sont présentés sur la figure 1C. L'analyse des activités CAT obtenue démontre la capacité de l'anticorps intracellulaire modifié, préparé à 10 partir de l'anticorps Y13-259, d'antagoniser l'activité du Ras oncogénique.

Le plasmide psv2.ScFv.ras cotransféré avec un plasmide permettant l'expression d'un oncogène doué d'activité tyrosine kinase, l'oncogène HER2 (human epidermal growth factor type II) bloque également son activité sur le plasmide "CAT" test (figure 1).

15 b) Formation de foyers de cellules transformées : Les cellules cancéreuses ont la propriété de former des foyers de transformation et notamment les fibroblastes NIH 3T3 exprimant un Ras oncogénique (Barlat et coll., Oncogene (1993), B, 215-218).

Les cellules NIH 3T3 sont cultivées comme dans le test précédent dans un milieu Dulbecco modifié Eagle (DMEM) contenant 10 % de sérum de veau fétal, à 20 37°C dans un environnement humide contenant 5 % de CO₂. Ces cellules sont ensuite co-transférées avec un Ras oncogénique : Ha-ras Val12, le plasmide psv2.ScFv.ras (Cf a) ci-dessus), et un excès de 10 fois du gène de résistance à la néomycine, par la technique de transfection aux lipides cationiques (Schweighoffer et coll. Science, 256, 825-827, 1992). La même quantité totale d'ADN est transférée pour chaque boîte.

25 24 heures après la transfection, les cellules transférées provenant de chaque boîte de pétri de 100 mm sont divisées dans un rapport 1 à 10 et cultivées dans le même milieu mais en présence de G418 (GIBCO/BRL) à 0,4 mg par ml de milieu. Le nombre de foyers de transformation obtenu par µg d'ADN transféré est comptabilisé après 14 jours de culture.

30 Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau ci-dessous. Ils représentent la moyenne de quatre essais indépendants.

TABLEAU

Transformation de cellules NIH 3T3 par Ha-ras Val12 en présence d'anticorps intracellulaire anti-ras

Plasmides transfectés	Nombre de foyers par µg d'ADN transfecté
Ha-Ras Val12	110
psv2.ScFv.ras	2
Ha-Ras Val12 + psv2.ScFv.ras	30

5 Les résultats obtenus montrent clairement que l'anticorps intracellulaire anti-ras diminue très fortement le pouvoir transformant d'un gène ras oncogénique.

Par ailleurs, vu les résultats obtenus en a), l'expression de ce fragment ScFv de l'anticorps Y13-159 devrait également empêcher la transformation par d'autres oncogènes tel HER1, HER2 facilitant l'activation des protéines Ras cellulaires.

10 Il est entendu que l'homme du métier peut, sur la base des résultats décrits dans la présente demande, reproduire l'invention avec des séquences d'acides nucléiques codant pour des anticorps intracellulaires (tels que des fragments ScFv) dirigés contre d'autres composants cellulaires. Ceux-ci peuvent être préparés soit à partir d'anticorps connus dirigés contre des composants cellulaires, soit par identification d'un antigène à neutraliser, immunisation au moyen de cet antigène ou 15 d'un épitope préféré de celui-ci, puis préparation de l'anticorps intracellulaire à partir de l'anticorps, de son ARNm, ou de hybridome obtenus. D'autres composants impliqués dans des processus de transformation cellulaire peuvent ainsi être ciblés. Par exemple, d'autres séquences d'ADN codant pour des anticorps intracellulaires de liaison 20 anti-ras peuvent être préparées selon la même méthodologie, à partir des hybridomes M38, M8, M70, M90 et M30 (ATCC HB 9158), dont les anticorps sont dirigés respectivement contre les résidus 1 à 23, 24 à 69, 90 à 106, 107 à 130 et 131 à 152 de la protéine Ha-Ras. De plus, comme indiqué plus haut, des vecteurs portant simultanément plusieurs séquences codant pour différents anticorps intracellulaires 25 peuvent être avantageusement préparés, pour conférer une activité neutralisante supérieure.

Exemple 2 : Clonage et expression d'une séquence d'ADN codant pour un anticorps intracellulaire anti-GAP

Cet exemple décrit le clonage et l'expression d'une séquence d'acides nucléiques codant pour une protéine intracellulaire de liaison reproduisant les 5 propriétés d'un anticorps monoclonal dirigé contre la protéine GAP.

La protéine GAP (pour GTPase Activating Protein) est impliquée dans la voie de signalisation ras-dépendante. Elle interagit avec les protéines ras de manière catalytique et multiplie par 100 à 200 la vitesse d'hydrolyse du GTP mesurée *in vitro* pour la protéine p21 normale. Différents travaux ont montré que le domaine 10 catalytique de cette protéine de 1044 acides aminés environ était situé dans la région carboxy-terminale (résidus 702-1044), et que cette région était responsable de l'interaction de la protéine GAP avec les protéines ras (Cf WO91/02749).

Il a maintenant été montré qu'un anticorps monoclonal dirigé contre le domaine dit "SH3" de la protéine GAP neutralisait les fonctions des protéines Ras 15 oncogéniques dans l'oeuf de Xénope (Duchesne et coll., Science, 259, 525-528, 1993).

Selon la méthodologie décrite en 1.1., il est possible de synthétiser une 20 séquence d'ADN codant pour un anticorps intracellulaire (fragment ScFv) correspondant à cet anticorps (SEQ ID n° 2, résidus 11 à 250, figure 1B). Une telle séquence, incorporée à un vecteur peut permettre d'inhiber le pouvoir transformant d'un gène ras oncogénique dans les cellules tumorales.

Par ailleurs, la demanderesse a également identifié plus précisément les épitopes reconnus par cet anticorps. Ces épitopes ont ensuite été synthétisés artificiellement, et peuvent être utilisés pour générer de nouveaux anticorps neutralisants pouvant servir à la mise en oeuvre de l'invention.

25 a) Identification plus précise :

L'identification a été réalisée par la technique "d'épitope scanning". Cette technique est basée sur le principe qu'un anticorps donné peut réagir avec des peptides de 5 à 15 acides aminés. De ce fait, l'identification d'épitopes séquentiels peut être obtenue en préparant un jeu complet de peptides recouvrants, de 5-15 acides aminés, 30 correspondants à la séquence complète de l'antigène considéré. Cette technique a été utilisée pour déterminer les épitopes fonctionnels du domaine "SH3" de GAP. Pour

cela, la totalité de ce domaine a été explorée par recouvrements séquentiels, par synthèse d'un décapeptide tous les 2 acides aminés.

- Synthèse des peptides recouvrants.

5 35 peptides couvrant la totalité du fragment de la figure 1 ont été synthétisés chimiquement. La synthèse a été effectuée en double, sur 2 supports indépendants, par la méthode Fmoc/t-butyl sur phase solide (kit Cambridge Research Biochemicals).

- Mise en évidence des épitopes fonctionnels.

10 Les épitopes fonctionnels reconnus par l'anticorps Ac200 ont été révélés en test ELISA par un anticorps de lapin anti-souris couplé à la peroxydase. Le substrat chromogénique de l'enzyme utilisé est l'amino-di-(3-ethylbenzothiazodine sulfonate) (ABTS).

Les résultats obtenus montrent que les épitopes reconnus par cet anticorps sont les suivants :

- 15 - PVEDRRRVRAI
 - EISF
 - EDGWM

20 Ces épitopes peuvent être utilisés selon les techniques classiques de l'homme du métier pour générer des anticorps neutralisant les effets de ras. Ces anticorps ou hybridomes les produisant sont ensuite utilisés pour générer des séquences d'acides nucléiques et des vecteurs de l'invention, selon la méthodologie décrite précédemment.

Exemple 3 : Préparation d'une séquence d'acides nucléiques codant pour un anticorps intracellulaire anti-Ki-ras à partir d'ARNm extraits de rates de souris immunisées avec des peptides dérivés des parties hypervariables de Ki-Ras (2A et 2B)

25 Cet exemple décrit la préparation de séquences d'acides nucléiques codant pour des anticorps intracellulaires (tels que des fragments ScFv) selon l'invention par identification d'un antigène à neutraliser, immunisation au moyen de cet antigène ou d'un épitope préféré de celui-ci, puis préparation de la séquence d'acides nucléiques à partir de l'anticorps, de son ARNm, ou de hybride obtenu.

Cet exemple démontre la possibilité d'appliquer la présente invention à tout antigène ou épitope désiré, même lorsqu'aucun anticorps monoclonal dirigé contre ledit antigène ou épitope n'est disponible.

L'antigène ciblé dans cet exemple est la protéine Ki-ras. Plus précisément, les 5 antigènes utilisés pour l'immunisation sont les peptides de 25 et 24 acides aminés correspondant aux extrémités terminales des protéines Ki-Ras 2A et 2B suivants :

- Peptide 2A : QYRLKKISKEEKTPGCVKIKKCIIM
- Peptide 2B : KYREKNNSKGKKKKKSCKCIIM

Après immunisation de souris avec ces peptides, selon les techniques 10 classiques de l'immunologie, les rates sont extraites et les ADNc sont préparés à partir des ARNm. Les ADNc codant pour les régions variables sont ensuite clonés, ce qui aboutit à la constitution d'une banque de phages exprimant les ScFv correspondant à la totalité du répertoire des souris utilisées. Les anticorps intracellulaires (fragments ScFv) reconnaissant les peptides 2A et 2B sont ensuite identifiés et isolés par des 15 étapes successives de sélection par affinité sur colonne et sur plaque de microtitration

Ces ScFv sont ensuite testés fonctionnellement selon le protocole décrit dans l'exemple 1.

La stratégie développée dans cet exemple permet d'une manière avantageuse 20 de sélectionner des anticorps intracellulaires spécifiques des oncogènes Ki-Ras, qui n'affecteront donc pas les autres protooncogènes Ras. La sélectivité de tels outils est donc non seulement cellulaire (du fait du découplage des voies de transduction dans les cellules transformées par Ras) mais aussi moléculaire.

Exemple 4 : Préparation d'une séquence d'acides nucléiques codant pour un anticorps intracellulaire anti-p53 mutées

25 Cet exemple décrit la préparation de séquences d'acides nucléiques codant pour des anticorps intracellulaires (tels que des fragments ScFv) dirigés contre des protéines p53 mutées. Ces anticorps intracellulaires sont obtenus à partir de différents anticorps monoclonaux dirigés contre lesdites protéines p53 mutées.

Le gène codant pour la protéine p53 est altéré dans un très grand nombre de 30 cellules tumorales (Caron de Fromentel et Soussi, Genes, 4, 1-15, 1992). La protéine p53 mutée n'a pas la même conformation que la p53 sauvage (Lane et Benchimol, Genes Dev. 4, 1-8, 1990). Ce changement de conformation peut être détecté par des

anticorps monoclonaux (Milner et Cook, Virology, 154, 21-30, 1986 ; Milner, Nature, 310, 143-145, 1984).

Les anticorps pAB 240 reconnaissent les formes mutées des protéines p53.

L'expression intracellulaire de fragment ScFv d'anticorps spécifiques de p53
5 mutée ou de protéines interagissant spécifiquement avec ces protéines p53 mutées devrait induire un effet bénéfique dans les tumeurs présentant une p53 mutée.

Exemple 5 : Clonage et expression d'une séquence d'ADN codant pour un anticorps intracellulaire anti-virus du papillome

Cet exemple décrit le clonage et l'expression d'une séquence d'ADN codant
10 pour un anticorps intracellulaire (fragment ScFv) dirigé contre une protéine du virus du papillome humain (HPV).

La protéine virale ciblée est la protéine E6. Cette protéine est produite par les virus HPV 16 et 18, qui sont responsables de 90 % des cancers du cervix chez la femme et ont été identifiés dans des lésions épithéliales pré-cancéreuses (Riou et al.,
15 Lancet 335 (1990) 117). Le produit du gène E6 conduit à la formation de tumeurs en diminuant fortement la quantité de p53 sauvage, un anti-oncogène, dans les cellules HPV-positives (Wrede et al., Mol. Carcinog. 4 (1991) 171). Dans d'autres tumeurs, p53 est inhibée par des mécanismes différents : mutation (Cf exemple 4) ou association avec des protéines telles que MDM2.

20 La séquence de la protéine E6 a été décrite dans la littérature (Hawley-Nelson et al., EMBO J. 8 (1989) 3905; Münger et al., J. Virol. 63 (1989) 4417). Des régions particulières de cette protéine peuvent être identifiées par "epitope scanning" (Cf exemple 2) puis utilisées pour immuniser des souris selon le protocole décrit dans l'exemple 3. La séquence d'ADN codant pour l'anticorps intracellulaire (fragment ScFv) dirigé contre la protéine E6 du virus du papillome humain (HPV) est ensuite préparée selon la méthodologie décrite précédemment. La fonctionnalité de cette séquence est démontrée après expression *in vivo*, par mesure :

- de l'augmentation du taux de p53 sauvage dans les cellules exprimant E6
- de la réversion morphologique des cellules transformées par HPV,
- 30 - du blocage des effets de E6 sur la transactivation de p53, et
- de l'inhibition de la transformation par E6 de kératinocytes et de fibroblastes humains.

Exemple 6 : Préparation d'une séquence d'acides nucléiques codant pour un anticorps intracellulaire anti-HIV à partir d'ARNm extraits de rates de souris immunisées avec des peptides dérivés des régions actives des protéines tat, rev et NCP7.

5 Cet exemple décrit la préparation de séquences d'acides nucléiques codant pour des anticorps intracellulaires selon l'invention (tels que des fragments ScFv), par identification d'un antigène à neutraliser, immunisation au moyen de cet antigène ou d'un épitope préféré de celui-ci, puis préparation de la séquence d'acides nucléiques à partir de l'anticorps, de son ARNm, ou de hybridome obtenus.

10 Cet exemple démontre encore la possibilité d'appliquer la présente invention à tout antigène ou épitope désiré, même lorsqu'aucun anticorps monoclonal dirigé contre ledit antigène ou épitope n'a été décrit dans l'art antérieur.

15 Les antigènes ciblés dans cet exemple sont les protéines tat, rev et NCP7 du virus HIV. Plus précisément, les antigènes utilisés pour l'immunisation sont les peptides suivants de 6, 9 et 16 acides aminés, correspondants aux régions de ces protéines responsables de leur interaction avec les ARNm (pour tat et rev) ou de la dimérisation des ARN (pour NCP7) :

- 20
- Peptide tat : RKKRRQRRR
 - Peptide rev : RQARRNRRRRWRERQR
 - Peptide NCP7 : RAPRK

Après immunisation de souris avec ces peptides, selon les techniques classiques de l'immunologie, les rates sont extraites et les ADNc sont préparés à partir des ARNm. Les ADNc codant pour les régions variables sont ensuite clonés, ce qui aboutit à la constitution d'une banque de phages exprimant les ScFv correspondant à la 25 totalité du répertoire des souris utilisées. Les anticorps intracellulaires (fragments ScFv) reconnaissant les peptides tat, rev et NCP7 sont ensuite identifiés et isolés par des étapes successives de sélection par affinité sur colonne et sur plaque de microtitration

Ces ScFv sont ensuite testés fonctionnellement pour leur capacité à bloquer le 30 cycle répliquatif du virus HIV.

LISTE DE SEQUENCES

(1) INFORMATION GENERALE:

5

(i) DEPOSANT:

- (A) NOM: RHONE-POULENC RORER S.A.
(B) RUE: 20, avenue R. ARON
(C) VILLE: ANTONY
(E) PAYS: FRANCE
(F) CODE POSTAL: 920165

(ii) TITRE DE L' INVENTION: Séquences nucléiques, vecteurs les
15 contenant, compositions pharmaceutiques et utilisations
thérapeutiques.

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 2

(iv) FORME LISIBLE PAR ORDINATEUR:

- (A) TYPE DE SUPPORT: Tape
 - (B) ORDINATEUR: IBM PC compatible
 - (C) SYSTEME D' EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS
 - (D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version

25 (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 1:

(i) CARACTÉRISTIQUES DE LA SÉQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 870 paires de bases
 - (B) TYPE: acide nucléique
 - (C) NOMBRE DE BRINS: double
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNC

35 (iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

40 (ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONNELLE:
(A) NOM/CLE: CDS
(B) EMPLACEMENT: 1-870

45 (ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONNELLE:
 (A) NOM/CLE: misc_feature
 (B) EMPLACEMENT: 442..486
 (D) AUTRES RENSEIGNEMENTS: /

50 (ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONNELLE:
(A) NOM/CLE: misc feature
(B) EMPLACEMENT: 82..810
(D) AUTRES RENSEIGNEMENTS: /

55 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

TCA	AGG	AGA	CAG	TCT	ATA	AGA	AAT	ACC	TAT	TCG	ACG	GCA	GCC	GCT	GGA
Ser	Arg	Arg	Gln	Ser	Ile	Arg	Asn	Thr	Tyr	Ser	Thr	Ala	Ala	Ala	Gly

18

60 TTG TTA TTA CTC GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCT CAG GTG AAA CTG CAG 96
 Leu Leu Leu Leu Ala Ala Gln Pro Ala Met Ala Gln Val Lys Leu Gln
 20 25 30

96

	CAG TCA GGA GGA GGC TTA GTG CAG CCT GGA AGG TCC CTG AAA CTC TCC Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Lys Leu Ser 35 40 45	144
5	TGT GTA GTC TCT GGA TTC ACT TTC AGT AAC TAT GGA ATG AAC TGG ATT Cys Val Val Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Gly Met Asn Trp Ile 50 55 60	192
10	CGC CAG ACT CCA GGG AAG GGA CTG GAG TGG GTT GCA TAC ATT AGT AGT Arg Gln Thr Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Tyr Ile Ser Ser 65 70 75 80	240
15	GGT AGC AGT TAC CTC TAC TAT GCA GAA ACG GTG AAG GGC CGA TTC ACC Gly Ser Ser Tyr Leu Tyr Tyr Ala Glu Thr Val Lys Gly Arg Phe Thr 85 90 95	288
20	ATC TCC AGA GAC AAT GCC AAG AAC ACC CTG TAC CTG CAA ATG ACC AGT Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Thr Ser 100 105 110	336
25	CTG AGG TCT GAA GAC ACT GCC TTG TAT TAC TGT GCA AGA CAT GAG GGT Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala Arg His Glu Gly 115 120 125	384
30	ACG GGT ACC GAC TTC TTT GAT TAC TGG GGC CAA GGG ACC ACG GTC ACC Thr Gly Thr Asp Phe Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr 130 135 140	432
35	GTC TCC TCA GGT GGA GGC GGT TCA GGC GGA GGT GGC TCT GGC GGT GGC Val Ser Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly 145 150 155 160	480
40	GGA TCG GAC GTT GAG CTC ACC CAG TCT CCA CAT TCC CTG TCT GCA TCT Gly Ser Asp Val Glu Leu Thr Gln Ser Pro His Ser Leu Ser Ala Ser 165 170 175	528
45	CTG GGA GAA ACT GTC TCC ATC GAA TGT CTA GCA AGT GAG GGC ATT TCC Leu Gly Glu Thr Val Ser Ile Glu Cys Leu Ala Ser Glu Gly Ile Ser 180 185 190	576
50	AAT TAT TTA GCG TGG TAT CAG CAG AAG CCA GGG AAA TCT CCT CAG CTC Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Gln Leu 195 200 205	624
55	CTG ATC TAT TAT GCA AGT AGC TTG CAG GAT GGG GTC CCA TCA CGG TTC Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Ser Leu Gln Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe 210 215 220	672
60	AGT GGC AGT GGA TCT GGC ACA CAG TTT TCT CTC AAG ATC AGC AAC ATG Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Ser Leu Lys Ile Ser Asn Met 225 230 235 240	720
	CAA CCT GAA GAT GAA GGG GTT TAT TAC TGT CAA CAG GCT TAC AAG TAT Gln Pro Glu Asp Glu Gly Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Tyr Lys Tyr 245 250 255	768
	CCT TCC ACG TTT GGA GCT GGC ACC AAG CTG GAA ATA AAA CGG GCG GCC Pro Ser Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Ala 260 265 270	816
	GCA GAA CAA AAA CTC ATC TCA GAA GAG GAT CTG AAT TAA TAA GAA TTC Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn * * Glu Phe	864

275

280

285

870

5 ACT GGC
 Thr Gly
 290

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 2:

10	(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE: (A) LONGUEUR: 810 paires de bases (B) TYPE: acide nucléique (C) NOMBRE DE BRINS: double (D) CONFIGURATION: linéaire	
15	(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNC	
20	(iii) HYPOTHETIQUE: NON	
25	(iv) ANTI-SENS: NON	
30	(ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONNELLE: (A) NOM/CLE: CDS (B) EMPLACEMENT: 1..810	
35	(ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONNELLE: (A) NOM/CLE: misc feature (B) EMPLACEMENT: 382..426 (D) AUTRES RENSEIGNEMENTS: /product= "Linker"	
40	(ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONNELLE: (A) NOM/CLE: misc feature (B) EMPLACEMENT: 31..753 (D) AUTRES RENSEIGNEMENTS: /product= "ScFv anti-GAP"	
45	(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:	
50	TTA TTA CTC GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC CAG GTC CAA CTG CAG GAG Leu Leu Leu Ala Ala Gln Pro Ala Met Ala Gln Val Gln Leu Gln Glu 1 5 10 15	48
55	TCA GGA CCT GGC CTA GGG CAG CCC GCA CAG AGC ATT TCC ATA ACC TGC Ser Gly Pro Gly Leu Gly Gln Pro Ala Gln Ser Ile Ser Ile Thr Cys 20 25 30	96
60	ACA GTC TCT GGT TTC TCA TTA AGT AGC TAT GGT GTA CAC TGG GTT CGC Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr Gly Val His Trp Val Arg 35 40 45	144
65	CAG TCT CCA GGA AAG GGT CTG GAG TGG CTG GGA GTG ATA TGG AGA GGT Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Arg Gly 50 55 60	192
70	GGA GGC ACA GAC TAC AAT GCA GCC TTC ATG TCC AGA CTG AGC ATC ACC Gly Gly Thr Asp Tyr Asn Ala Ala Phe Met Ser Arg Leu Ser Ile Thr 65 70 75 80	240
75	AAG GAC AAC TCC AAG AGC CAA GTT TTC TTT AAA TTG AAC AGT CTG CAA Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Phe Lys Leu Asn Ser Leu Gln 85 90 95	288
80	CCT GAT GAC ACT GCC ATG TAC TAC TGT GCC AAA AGG GGT GGC CCG GGG	336

	Pro Asp Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Lys Arg Gly Gly Pro Gly		
	100	105	110
5	TAT TTC GAT GTC TGG GGC CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA GGT Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly		384
	115	120	125
10	GGA GGC GGT TCA GGC GGA GGT GGC TCT AGC GGT GGC GGA TCG GAC ATT Gly Gly Ser Gly Gly Ser Ser Gly Gly Ser Asp Ile		432
	130	135	140
15	GAG CTC ACC CAG TCT CCA GCC TCC CTA TCT GCA TCT GTG GGA GAA ACT Glu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Glu Thr		480
	145	150	155
20	GTC ACC ATG ACA TGT CGA GCA AGT GAG AAT ATT TAC AGT AAT TTA GCA Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Asn Leu Ala		528
	165	170	175
25	TGG TAT CAG CAG AAA CAG GGA AAG TCT CCT CAG CTC CTG GTC TAT GCT Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val Tyr Ala		576
	180	185	190
30	GCA ACA AAA CCA GGA AAT GGT GTG CCA TCA AGG TTC AGT GGC AGT GGA Ala Thr Lys Pro Gly Asn Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly		624
	195	200	205
35	TCA GGC ACA CAA TTT TCT CTG AAG ATC AAC AGC CTG CAG CCT GAA GAT Ser Gly Thr Gln Phe Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Pro Glu Asp		672
	210	215	220
40	CTT GGG AAC TAT TAC TGT CTA CAT TTT TAT GGG ACT CCG TAT AGG TTC Leu Gly Asn Tyr Tyr Cys Leu His Phe Tyr Gly Thr Pro Tyr Arg Phe		720
	225	230	235
	240		
35	GGC GGG GGC ACC AAG CTG GAA ACG AAA CGG GCG GCC GCA GAA CAA AAA Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Thr Lys Arg Ala Ala Ala Glu Gln Lys		768
	245	250	255
40	CTC ATC TCA GAA GAG GAT CTG AAT TAA TAA GAA TTC ACT GGC Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn * * Glu Phe Thr Gly		810
	260	265	270

REVENDICATIONS

1. Séquence d'acides nucléiques comprenant un gène codant pour une protéine intracellulaire de liaison (PIL) sous le contrôle d'un promoteur fonctionnel dans les cellules mammifère.
- 5 2. Séquence d'acides nucléiques selon la revendication 1 caractérisée en ce qu'elle code pour une PIL agissant sur la prolifération cellulaire, sur la synthèse de métabolites, sur la synthèse protéique, sur la réPLICATION et/ou la transcription de l'ADN, ou sur le cycle d'infection d'un virus.
- 10 3. Séquence d'acides nucléiques selon les revendications 1 ou 2 caractérisée en ce que la PIL est un anticorps intracellulaire ou un fragment et/ou dérivé d'un tel anticorps.
4. Séquence d'acides nucléiques selon la revendication 3 caractérisée en ce que la PIL est un fragment Fab ou F(ab)'2 d'anticorps.
- 15 5. Séquence d'acides nucléiques selon la revendication 3 caractérisée en ce que la PIL est un peptide comprenant au moins un peptide correspondant au site de liaison de la région variable de la chaîne légère d'un anticorps relié par un linker peptidique à un peptide correspondant au site de liaison de la région variable de la chaîne lourde d'un anticorps.
- 20 6. Séquence d'acides nucléiques selon l'une des revendications 1 à 6 caractérisée en ce que le promoteur fonctionnel dans les cellules mammifère est choisi parmi les promoteurs viraux, cellulaires ou artificiels.
7. Séquence d'acides nucléiques selon l'une des revendications 1 à 6 caractérisée en ce qu'elle est incorporée dans un vecteur.
- 25 8. Séquence d'acides nucléiques selon la revendication 7 caractérisée en ce qu'elle est incorporée dans un vecteur viral.
9. Virus recombinant défectif comprenant dans son génome une séquence d'acides nucléiques selon l'une des revendications 1 à 8.

10. Virus recombinant défectif selon la revendication 9 caractérisé en ce qu'il est choisi parmi les rétrovirus, les adénovirus, les virus adéno-associés, le virus de la vaccine et le virus HSV.
11. Virus recombinant défectif caractérisé en ce qu'il comporte dans son génome une séquence d'acides nucléiques comprenant un gène au moins codant pour un anticorps intracellulaire ou un fragment et/ou dérivé d'un tel anticorps.
12. Virus recombinant défectif selon la revendication 11 caractérisé en ce que l'anticorps intracellulaire est un peptide comprenant au moins un peptide correspondant au site de liaison de la région variable de la chaîne légère d'un anticorps relié par un linker peptidique à un peptide correspondant au site de liaison de la région variable de la chaîne lourde d'un anticorps.
13. Virus recombinant défectif selon la revendication 11 ou 12 caractérisé en ce que l'anticorps intracellulaire est un anticorps dirigé contre un composant de la cellule cible impliqué dans la prolifération cellulaire.
14. Virus recombinant défectif selon la revendication 13 caractérisé en ce que l'anticorps intracellulaire est un anticorps dirigé contre un oncogène ou contre un facteur de la voie de signalisation d'un oncogène.
15. Virus recombinant défectif selon la revendication 14 caractérisé en ce que l'oncogène est choisi parmi les oncogènes myc, myb, ras, fos, jun et erb.
16. Virus recombinant défectif selon les revendications 11 à 15 caractérisé en ce qu'il est choisi parmi les rétrovirus, les adénovirus, les virus adéno-associés, le virus de la vaccine et le virus HSV.
17. Vecteur, notamment viral, comprenant au moins deux séquences d'acides nucléiques selon la revendication 1 codant pour des protéines intracellulaires de liaison dirigées contre des épitopes différents d'un ou de plusieurs antigènes.
18. Composition pharmaceutique comprenant au moins une séquence d'acides nucléiques selon l'une des revendications 1 à 8 ou un virus recombinant selon l'une des revendications 9 à 17.

19. Composition pharmaceutique selon la revendication 18 caractérisée en ce qu'elle comprend au moins une séquence d'acides nucléiques selon l'une des revendications 1 à 8 sous forme de liposome, de complexe avec des protéines nucléaires, des lipides ou du dextran, ou sous forme brute.
- 5 20. Composition pharmaceutique selon la revendication 19 caractérisée en ce qu'elle comprend au moins une séquence d'acides nucléiques selon la revendication 5.
21. Composition pharmaceutique selon la revendication 18 caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un virus recombinant selon la revendication 12.
- 10 22. Composition pharmaceutique selon la revendication 21 caractérisée en ce que le virus recombinant est choisi parmi les adénovirus, les rétrovirus, ou les virus adéno-associés.
23. Utilisation d'une séquence d'acides nucléiques selon la revendication 1 pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement des cancers.
- 15 24. Utilisation d'une séquence d'acides nucléiques selon la revendication 1 pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement des affections virales.

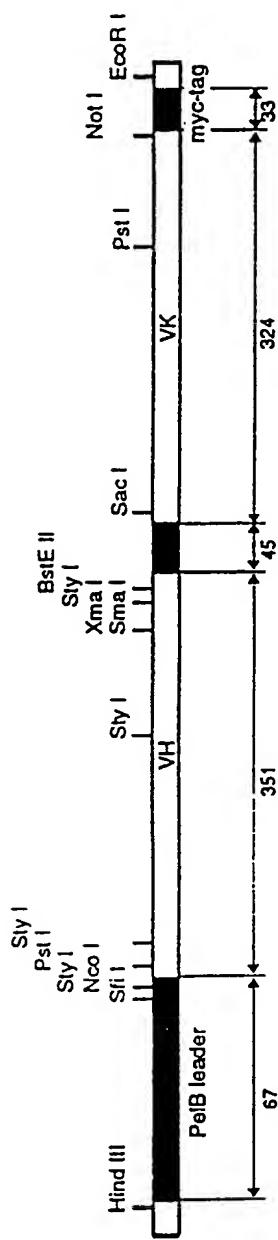


Figure 1A

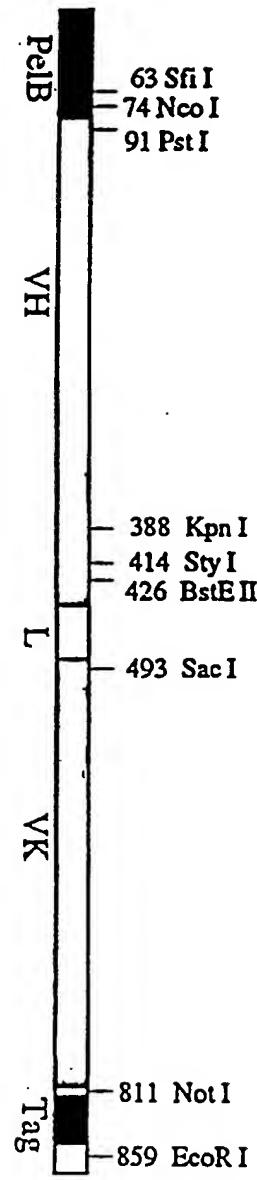


Figure 1B

2/2

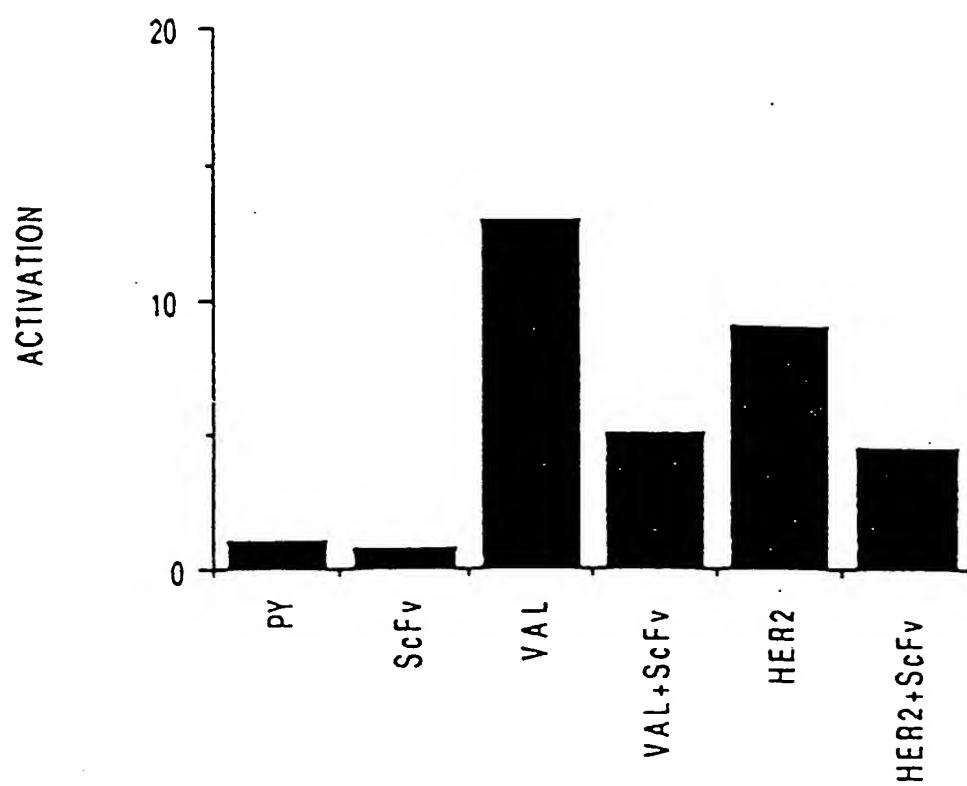


Figure 1C